

GOx@Fe₃O₄-HNTs 微囊反应器的构筑 及多酶级联催化性能

黄雨晴¹, 刘妍¹, 张宏丽¹, 林森^{1,2}, 孙仕勇^{1,2}, GOLUBEV Evgeny³,
吕瑞¹, KOTOVA Olga³, KOTOVA Elena⁴

- (1. 西南科技大学环境与资源学院, 固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 绵阳 621010;
2. 西南科技大学非金属矿产地质及其开发利用四川省高等学校重点实验室, 绵阳 621010;
3. 俄罗斯科学院乌拉尔分院科米科学中心地质研究所, 瑟克特夫卡尔 167982, 俄罗斯;
4. 圣彼得堡国立矿业大学, 圣彼得堡 199106, 俄罗斯)

摘要 细胞内或细胞间的微空间使得生物体内的各种酶促反应能够高效有序地进行。基于此, 本文结合天然酶-纳米酶二者的优势, 构筑了一种模拟体内酶促级联反应的微囊反应器。首先, 以天然硅铝酸盐矿物埃洛石纳米管(HNTs)为载体, 在其表面原位生成具有类辣根过氧化物酶活性的四氧化三铁(Fe₃O₄); 随后, 将其作为囊壁材料封装天然葡萄糖氧化酶(GOx), 构筑GOx@Fe₃O₄-HNTs微囊反应器。当向体系中加入葡萄糖时, 微囊反应器内的GOx先将葡萄糖转化为葡萄糖酸和过氧化氢(H₂O₂), 之后H₂O₂继续被囊壁中的Fe₃O₄催化转化为羟基自由基, 触发底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色。其中, Fe₃O₄-HNTs作为囊壁材料不仅使囊内GOx免受外界环境干扰, 还可与GOx构建级联催化反应体系, 这种酶-纳米酶微囊化级联体系具有比天然酶系统更优异的催化性能和反应稳定性。此外, 因磁性Fe₃O₄的参与, 材料还具有可回收性和重复使用性。这种酶-纳米酶复合微囊反应器为模拟生物体内限域环境下的多酶反应体系提供了新方法, 同时为后续生物分析与仿生催化领域的进一步研究奠定了基础。

关键词 纳米酶; 微囊反应器; 埃洛石纳米管; 葡萄糖氧化酶; 级联反应

中图分类号 O643.3 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20230403

Construction of GOx@Fe₃O₄-HNTs Microcapsule Reactor and Its Multi-enzyme Cascade Catalytic Performance

HUANG Yuqing¹, LIU Yan¹, ZHANG Hongli¹, LIN Sen^{1,2*}, SUN Shiyong^{1,2*},
GOLUBEV Evgeny³, LYU Rui¹, KOTOVA Olga³, KOTOVA Elena⁴

- (1. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle of Ministry of Education, School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;
2. Key Laboratory of Non-metallic Mineral Geology and Utilization in Sichuan Provincial Higher Education Institutions, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;
3. Yushkin's Institute of Geology, Komi Science Center, Ural Branch of RAS, Syktyvkar 167982, Russia;
4. St. Petersburg Mining State University, St. Petersburg 199106, Russia)

Abstract The intracellular or intercellular microspace effectively enables various enzymatic reactions in organisms

收稿日期: 2023-09-11. 网络首发日期: 2023-10-19.

联系人简介: 林森, 男, 博士, 特聘副教授, 主要从事矿物材料研究. E-mail: lsen@swust.edu.cn

孙仕勇, 男, 博士, 教授, 主要从事矿物功能材料研究. E-mail: shysun@swust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 42372056, 42061134018)、俄罗斯科学基金(批准号: 21-47-00019)和西南科技大学博士研究基金(批准号: 22zx7173)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.42372056, 42061134018), the Russian Science Foundation(No.21-47-00019) and the Doctoral Research Foundation of Southwest University of Science and Technology, China(No.22zx7173).

to proceed efficiently and orderly. Inspired from nature, this study combined the advantages of both natural enzymes and nanozymes to construct a microencapsulated reactor that simulates the enzymatic cascade reaction *in vivo*. First, the natural aluminosilicate mineral halloysite nanotubes (HNTs) were used as a carrier to *in situ* generate iron tetroxide (Fe_3O_4) with horseradish peroxidase-like activity on its surface. Then, it was used as a capsule wall material to encapsulate natural glucose oxidase (GOx), forming the GOx@ Fe_3O_4 -HNTs microcapsule reactor. When glucose is added into the system, the GOx within microcapsule reactor will first convert the glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide (H_2O_2), and the H_2O_2 will continue to be catalyzed by Fe_3O_4 from the capsule wall and converted into hydroxyl radicals, triggering the color development of the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Among them, Fe_3O_4 -HNTs not only serves as the capsule wall material to protect GOx from environmental interference, but also can conduct a cascade catalytic reaction system with GOx. This kind of enzyme-nanozyme microencapsulation cascade system makes it have better catalytic performance and reaction stability than the natural enzyme systems. In addition, due to the participation of magnetic Fe_3O_4 , the material is also recyclable and reusable. This enzyme-nanoenzyme composite microcapsule reactor provides a new method for simulating a multi-enzyme reaction system in the confined environment of organisms, and also lays a foundation for subsequent research in the fields of bioanalysis and biomimetic catalysis.

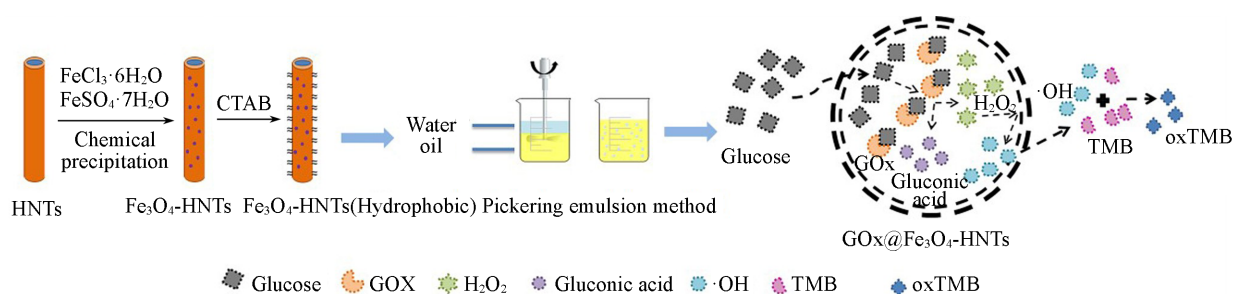
Keywords Nanoenzyme; Microcapsule reactor; Halloysite nanotube; Glucose oxidase; Cascade reaction

酶作为一类具有高底物特异性和选择性的纳米级生物催化剂,能够参与生物体内多种生物催化反应^[1]. 生物细胞内的代谢过程通常伴随着多种酶的协同催化作用,其中一种酶的催化产物可以作为另一种酶的反应底物,形成多酶级联催化体系,通过减少反应产物从一个活性位点到另一个活性位点的传递时间,实现催化反应效率的提高^[2,3]. 与单一酶催化相比,多酶级联催化不仅可以减少底物的传输与反应时间,而且由于细胞空间的限制,还能够最大限度地减少高活性中间体的扩散和分解,使酶促反应的整体效率得以提高. 然而,体外游离形式的多酶级联反应存在稳定性差、反应活性低、难以回收再利用以及传质距离远等问题,极大限制了其在实际领域中的应用^[4]. 为解决此问题,研究人员开始聚焦于选取具有类似天然酶功能的纳米酶,结合相应载体在体外构建固定化多酶级联催化体系. 与游离形式的酶催化体系相比,固定化多酶级联反应体系受酶的类型、酶浓度、载体的种类和形态等多种因素的影响. 因此,通过合理的构建策略,精确设计并构筑固定化多酶级联反应器以实现酶的高效催化是目前的研究热点. 近年来,经研究发现,通过层层自组装^[5]、共价结合^[6,7]和封装包埋^[8,9]等方式可以构筑多种类型的纳米反应器,以组建密闭空间内的酶级联反应,从而增强酶促反应局部的传质作用,提高其催化反应效率. Zhang等^[10]设计了一种基于多巴胺平台构建的三酶级联反应体系,通过合理组合包封包埋以及交联技术将 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和葡萄糖苷酶固定在聚多巴胺微胶囊中,构建得到多酶或多药物/细胞/基因反应系统,可应用于生物治疗、环境催化、生物传感等领域. Wang等^[11]采用共沉淀法将具有过氧化物酶类催化活性的NiPd中空纳米颗粒和葡萄糖氧化酶(GOx)同时固定在沸石咪唑酸骨架(ZIF-8)上,通过构建串联天然酶-人工酶的GOx/NiPd@ZIF-8催化反应体系制备得到一种可以快速检测葡萄糖的比色传感器,为纳米酶-天然酶之间级联催化体系的构筑以及生物检测应用提供了相应的启示. 因此,筛选具有高生物相容性、高反应稳定性以及成本低廉的载体材料是构筑多酶级联反应器的关键.

纳米管材料一般具有量子尺寸效应,且比表面积大,吸附性能强,通过共价或非共价等相互作用对有机/无机纳米管材料表面进行功能化,可以改变纳米管的表面性质,作为载体材料逐渐引起人们的广泛关注. 埃洛石纳米管(HNTs)是一种具有独特空心管状结构的天然铝硅酸盐粘土矿物,具有良好的吸附性、分散性、生物相容性等特性^[12-14],因管的内、外表面分别存在铝氧八面体($[\text{AlO}_6]^{9-}$)和硅氧四面体($[\text{SiO}_4]^{4-}$)基团,使其管腔内部和管壁表面分别带有正电荷和负电荷^[15,16]. 同时, HNTs表面存在Si—O—Si、Al—OH和Si—OH等基团,可以对其进行表面功能化修饰改性,包括有机硅烷改性、聚合物改性、纳米颗粒修饰等^[17-19]. 其中,对HNTs表面进行磁性纳米颗粒修饰构建的磁性纳米复合材料已

经在化学催化、生物传感、环境治理等领域得到应用^[20]。四氧化三铁(Fe_3O_4)是一类常见的磁性氧化物,具有良好的超顺磁性、生物相容性和光热转换效率,同时还表现出类过氧化物酶催化活性^[21,22]。Maleki等^[23]将 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒负载在埃洛石纳米管上,探索 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HNTs}$ 作为非均相催化剂的反应合成性能。结果表明,以苯甲醛、丙二腈和二美酮作为原料,以乙醇作为溶剂, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HNTs}$ 使用量为30 mg时,在反应温度为40 °C条件下成功合成出4*H*-吡喃衍生物,且催化剂表现出良好的重复利用率,表明所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HNTs}$ 材料可作为稳定高效的有机合成反应的纳米催化剂。Zhu等^[24]采用水热法结合原位还原法制备出 $\text{Ag}@\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{RHNTs}$ 纳米复合材料,并构建以 $\text{Ag}@\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{RHNTs}$ 为酶模拟物的过氧化氢(H_2O_2)比色传感平台,在牛奶和血清的 H_2O_2 检测中表现出了高效的灵敏性,当温度和pH值分别为55 °C和4时,传感器对于 H_2O_2 的检测范围为10~100 $\mu\text{mol/L}$,检测限低至0.7 $\mu\text{mol/L}$,比色传感系统所具有的高效催化性能与所制备材料反应过程中产生的 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}^{2-}$ 以及 h^+ 等活性自由基有关。Duan等^[25]采用化学沉淀法制备了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 矿物基磁性复合材料,并将其应用于甲基紫(MV)染料的吸附实验中。研究结果表明,所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 复合材料在较宽的pH值、金属离子浓度和温度范围内对于MV均表现出较高的吸附性能,其吸附动力学符合Langmuir模型,且经过回收的材料通过简单煅烧处理后能够再次利用,可作为阳离子染料废水处理的理想材料。经 Fe_3O_4 磁性颗粒表面修饰的HNTs作为酶固定化载体具有如下优点:(1) HNTs所具有的高比表面积能够为 Fe_3O_4 的原位合成提供平台;(2) Fe_3O_4 所具有的磁性使得材料能够回收再利用,降低反应成本。因此,通过以 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 作为酶固定化载体探索多酶级联反应体系的催化性质具有重要的研究意义。

研究表明,GOx可以将葡萄糖催化氧化为葡萄糖酸和 H_2O_2 , H_2O_2 能够被过氧化物酶或具有类过氧化物酶活性的纳米酶激活,产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$),进一步氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)发生显色反应^[26]。基于此,在本研究中,首先通过以粘土矿物埃洛石纳米管(HNTs)作为载体,利用化学沉淀法在HNTs表面原位生长 Fe_3O_4 纳米颗粒,并利用表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)对其表面进行疏水改性,制备具有磁性和类过氧化物酶活性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 囊壁材料。随后,利用皮克林乳液法,将GOx封装于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 微囊内,构建一种模拟细胞内酶促级联反应系统的 $\text{GOx}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 微囊反应器,并用于葡萄糖的检测(Scheme 1)。微囊反应器对于GOx的封装不仅可以保持GOx的酶催化活性和反应稳定性,其自身的磁性也提高了材料的重复使用性。这项工作为粘土矿物基天然酶-纳米酶多酶级联催化体系的构建提供了思路,对于拓展粘土矿物和金属氧化物在类酶催化效应研究领域的应用具有重要意义。



Scheme 1 Schematic of construction and cascade reaction process of $\text{GOx}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ microcapsule reactor

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

埃洛石纳米管(HNTs)购自十堰市玖福矿业有限公司;葡萄糖氧化酶(GOx)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和辣根过氧化物酶(HRP)购自合肥博美生物科技有限公司;无水乙醇、七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 纯度 $\geq 99\%$)和六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 纯度 $\geq 99\%$)购自上海阿拉丁生化科技有限公司。实验中所用化学试剂均为分析级,未经过进一步纯化直接使用。

X'Pert PRO型X射线衍射(XRD)仪,荷兰帕纳科公司;Spectrum One型傅里叶变换红外光谱

(FTIR)仪,美国PE仪器公司;ULTRA 55型200 kV场发射扫描电子显微镜(SEM),德国蔡司仪器公司;UV-2800A型紫外-可见(UV-Vis)分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;DM2000型光学显微镜,德国徕卡公司.

1.2 实验过程

1.2.1 Fe_3O_4 -HNTs的合成 参考文献[27]报道的方法制备 Fe_3O_4 -HNTs.首先,将1 g HNTs通过超声分散于100 mL超纯水中;然后,于70 °C下将0.9723 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.5000 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入到溶液中,搅拌30 min.随后,用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25%~28%)将溶液体系的pH值调至9~10,于70 °C下水浴老化5 h;最后,将反应结束后的样品用超纯水洗涤3次,于60 °C下干燥,备用.

1.2.2 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)对 Fe_3O_4 -HNTs的疏水改性 首先,分别将0.25, 0.50, 0.75和1.00 g的CTAB溶解于50 mL超纯水中.随后,向其中加入1 g Fe_3O_4 -HNTs,于60 °C、转速300 r/min的恒温振荡箱中振荡6 h后,过滤、洗涤3或4次,并置于60 °C烘箱中烘干,得到改性的 Fe_3O_4 -HNTs,记为 Fe_3O_4 -HNTs(CTAB).

1.2.3 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs复合微囊的制备 在甲苯中配制不同浓度(0.5, 1, 2 mg/mL)的改性 Fe_3O_4 -HNTs溶液,超声分散10 min使其分散均匀.在超纯水中配制浓度为0.04 mg/mL的GOx溶液,分别向不同浓度的改性 Fe_3O_4 -HNTs溶液中滴加200 μL GOx溶液,用高速匀浆机匀浆15 s,形成油包水型皮克林乳液.向该乳液中加入一定量的四甲氧基硅烷(TMOS)交联剂,静置24 h后用乙醇清洗多余的油相,最后将形成的 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs复合微囊转移到水相中.

1.2.4 Fe_3O_4 -HNTs类过氧化物酶活性测定 利用 H_2O_2 -TMB显色反应体系评估 Fe_3O_4 -HNTs的类过氧化物酶活性.首先,将200 μL TMB溶液(2 mg/mL)添加到4.68 mL醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4.0)中;然后,向其中加入10 μL H_2O_2 溶液(30%);最后,加入300 μL Fe_3O_4 -HNTs溶液(1 mg/mL),反应15 min后用紫外-可见分光光度计测定其在655 nm处的吸光度.

1.2.5 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs和天然酶的级联活性测定 以TMB作为反应底物测试 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs的级联反应活性.将TMB溶液(200 μL , 2 mg/mL)加入到含有一定量 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4)中,并加入一定量葡萄糖溶液(300 μL , 0.1 mol/L),于37 °C温育45 min,使用紫外-可见分光光度计测定655 nm处的吸光度.以TMB作为反应底物测试游离状态下 $\text{GOx}+\text{HRP}$ 的级联反应活性.分别将一定量GOx溶液和HRP溶液加入到含有一定量TMB(200 μL , 2 mg/mL)和葡萄糖(300 μL , 0.1 mol/L)的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4)中,于37 °C温育10 min,使用紫外-可见分光光度计测定655 nm处的吸光度.

1.2.6 pH和温度稳定性测定 将 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs和游离酶体系($\text{GOx}+\text{HRP}$)分别在不同pH值的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH=3.5~6.0, 0.1 mol/L)中放置5 h,测定酶活性,考察其pH稳定性;将 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs和游离酶体系($\text{HRP}+\text{GOx}$)分别在不同温度(30~90 °C)下温育30 min,测定酶活性,考察其温度稳定性.

1.2.7 动力学参数测定 在含有 Fe_3O_4 -HNTs空心微囊的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4)中加入不同体积(40, 60, 80, 100, 120, 140 μL)的 H_2O_2 (2 mol/L)和200 μL TMB(2 mg/mL),反应15 min后测试溶液吸光度,获取 Fe_3O_4 - H_2O_2 的反应动力学曲线(Lineweaver-Burk图),并利用方程(1)计算其表观动力学参数[米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{\max})].在含有 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs复合微囊的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4)中加入不同浓度(20, 40, 50, 60, 80, 100 mmol/ μL)的葡萄糖溶液和200 μL TMB(2 mg/mL),反应30 min后测试溶液吸光度,根据 Fe_3O_4 - H_2O_2 反应动力学曲线计算得到不同浓度葡萄糖条件下 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs复合微囊的过氧化氢产量,获取其反应动力学曲线,并利用方程(1)计算其 K_m 和 V_{\max} :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

式中: V ($\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)和 $[S]$ ($\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别表示反应初始速度和TMB或葡萄糖的浓度.

1.2.8 葡萄糖的检测 向4 mL醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=4)中加入300 μL $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -

HNTs复合微囊(1 mg/mL)和200 μ L TMB(2 mg/mL), 并分别加入500 μ L不同浓度(1, 10, 20, 40, 60, 100, 200 μ mol/L)的葡萄糖溶液, 于37 $^{\circ}$ C温育45 min, 利用紫外-可见分光光度计测定溶液在655 nm处的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

图1(A)显示了HNTs, Fe_3O_4 和经CTAB疏水改性后的 Fe_3O_4 -HNTs的XRD图谱. 与原始HNTs的特征峰相比, 在HNTs表面原位合成 Fe_3O_4 后, 仍然存在可归属于HNTs的(001)、(100)和(002)晶面的特征衍射峰, 且在 $2\theta=30.13^{\circ}$, 35.54° , 42.23° , 57.17° 和 62.50° 处出现了归属于磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒的特征衍射峰, 这说明利用化学沉淀法制备的改性 Fe_3O_4 -HNTs复合纳米材料仍然保留了HNTs和 Fe_3O_4 的结构

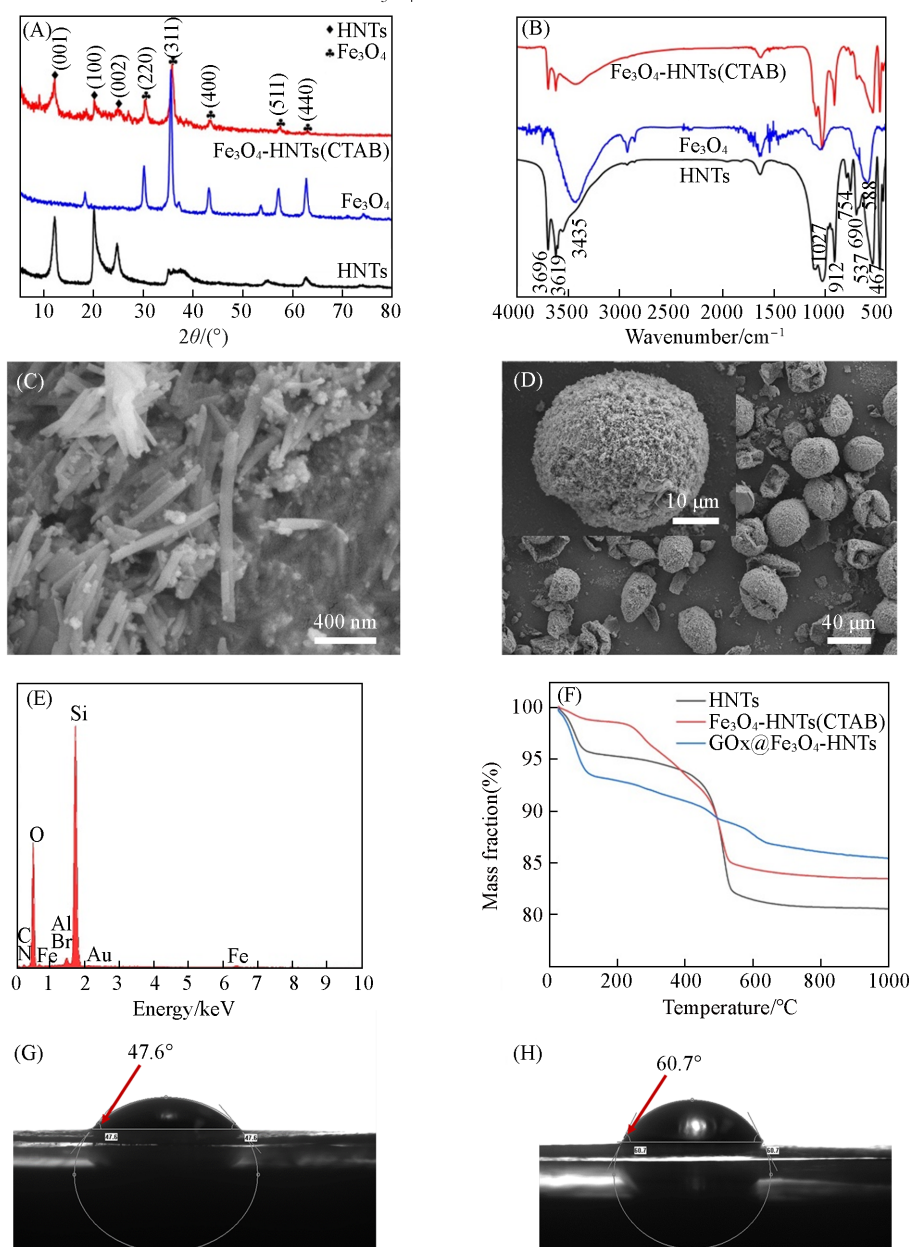


Fig. 1 XRD patterns(A) and FTIR spectra(B) of HNTs, Fe_3O_4 and Fe_3O_4 -HNTs(CTAB), SEM images of Fe_3O_4 -HNTs(CTAB)(C), $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs(D) and relevant energy spectrum(E) of $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs microcapsules, TG curves of HNTs, Fe_3O_4 -HNTs(CTAB) and $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs microcapsules(F) and surface contact angles of Fe_3O_4 -HNTs(G) and Fe_3O_4 -HNTs(CTAB)(H)

成分.

如图 1(B) 的 FTIR 光谱所示, HNTs 在高频区 3696 和 3619 cm^{-1} 处出现了较强的分裂峰, 这是由 HNTs 的 Al—OH 内表面羟基的 O—H 拉伸振动引起的, 912 cm^{-1} 处的吸收带归因于上述羟基的 O—H 弯曲振动, 出现在 467 和 537 cm^{-1} 处的吸收峰分别属于 Si—O—Si 和 Al—O—Si 的弯曲振动, 而在 690 , 754 和 1027 cm^{-1} 处的吸收峰为 Si—O—Si 的拉伸振动峰. HNTs 和 Fe_3O_4 的红外特征峰均出现在经 CTAB 疏水改性后的 Fe_3O_4 -HNTs 的 FTIR 光谱中, 其中 HNTs 的 O—H 键的拉伸振动和弯曲振动峰可能会与 Fe_3O_4 的 Fe—O 特征峰重叠.

样品的 SEM 照片[图 1(C)和(D)]显示, 在改性 Fe_3O_4 -HNTs 复合材料中, Fe_3O_4 纳米颗粒的确已负载在 HNTs 表面, 水相中的 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs 复合微囊经过脱水、干燥处理后, 微囊的形貌和结构仍然保持完整, 表明微囊经过交联剂 TMOS 交联后具有良好的结构稳定性, 在后续微囊包封 GOx 进行酶促级联反应的实验中, 不会因外界环境条件(溶液温度、浓度、pH 等)的变化而出现破裂或形变等问题, 保证了所制备材料级联反应实验的稳定性和高效性. 从复合微囊的能谱图[图 1(E)]中可以看出, 微囊内主要含有 O, Si, Al, Fe, C, N, Br 等元素, 其中 O, Si 和 Al 元素为 HNTs 中所含有的元素, O 和 Fe 元素来源于 Fe_3O_4 纳米颗粒, C, N 和 Br 元素来源于 GOx 和表面活性剂 CTAB, 所制备的复合微囊内所含元素种类与原料一致, 进一步表明通过皮克林乳液法, 以 Fe_3O_4 -HNTs 为囊壁, 已将 GOx 封装于 Fe_3O_4 -HNTs 微囊内.

图 1(F) 为 HNTs、改性 Fe_3O_4 -HNTs 复合材料以及 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs 复合微囊的热重曲线. 从图中可以看出, 所有样品从室温~ $200\text{ }^\circ\text{C}$ 时开始出现失重, 这可能是由于粘土矿物埃洛石的晶体结构中层间水的挥发所致; 在 $400\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$ 的温度区间内, HNTs 和改性 Fe_3O_4 -HNTs 的质量出现明显下降, 这主要是由于随着温度的逐渐升高, 埃洛石的表面羟基结构被破坏所致; 与 HNTs 和改性 Fe_3O_4 -HNTs 相比, 所制备的 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs 复合微囊在 $400\sim 1000\text{ }^\circ\text{C}$ 温度范围内的质量损失更小, 这表明 Fe_3O_4 -HNTs 囊壁对于囊内的 GOx 起到了保护作用.

Fe_3O_4 -HNTs 经表面活性剂 CTAB 改性前后的接触角如图 1(G) 和 (H) 所示. 从图中可以看出, Fe_3O_4 -HNTs 的水接触角为 47.6° , 而 Fe_3O_4 -HNTs(CTAB) 的水接触角为 60.7° , 表明 CTAB 对于 Fe_3O_4 -HNTs 的有机改性具有疏水效果.

2.2 微观形貌分析

2.2.1 油/水比例的影响 当向以 Fe_3O_4 -HNTs 为分散剂的甲苯相(油相)中滴入含 GOx 的超纯水后, 在匀浆机的快速搅拌下(1000 r/min), 以 CTAB 表面活性剂改性的 Fe_3O_4 -HNTs 在油/水界面的张力会降低, 从而形成油包水的 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs 复合微囊; 当向甲苯相(油相)乳液中滴入 TMOS 进行交联后, TMOS 的水解使微囊表面逐渐形成网络状结构的氧化硅层, 将 $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs 复合微囊从油相转移到水相中后, 可以保证微囊形貌与结构的完整性. 如图 2 所示, 所制备的复合微囊的粒径在 $30\sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 之间, 这可能是由于在油包水乳液形成的过程中, 匀浆机的搅拌子在乳液中不同位置的剪切力不同, 从而使得形成的微囊之间具有粒径差异. 皮克林乳液中油相与水相的比例、匀浆机的搅拌频率和强度等均能影响微囊的粒径. 随后, 固定匀浆机转速(1000 r/min)和油相中 Fe_3O_4 -HNTs 的浓度(2 mg/mL), 通过改变油相与水相的体积比($10:1$, $20:1$, $40:1$)来调控微囊的大小与形态. 从图 2 中可以看出, 当

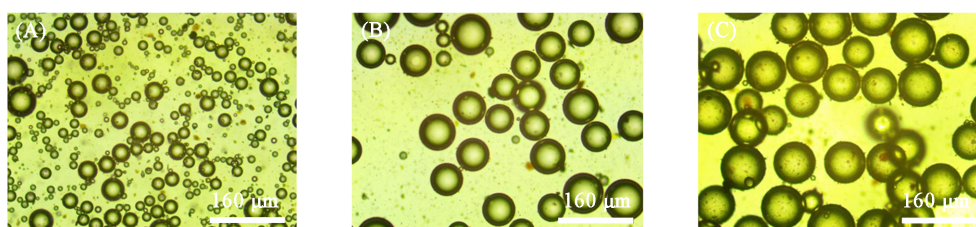


Fig. 2 Optical microscopy images of $\text{GOx}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ -HNTs microcapsules under the oil/water ratios of 10:1(A), 20:1(B) and 40:1(C)

油/水比为 10:1 时, 大部分微囊的直径小于 30 μm 且存在团聚现象, 这将影响后续交联剂在其表面的均匀分布; 当油/水比为 40:1 时, 微囊直径普遍大于 80 μm , 会导致后续交联反应效果下降, 使微囊在转移到水相的过程中出现形变或破损. 因此, 选择油/水比为 20:1 形成的微囊(直径约 80 μm)开展后续实验.

2.2.2 交联剂用量的影响 从水相中 Fe_3O_4 -HNTs 空心微囊的光学显微镜照片可以看出, TMOS 交联剂的添加量(50, 80, 100, 200 μL)可以显著影响 Fe_3O_4 -HNTs 空心微囊在水相中的形态. 从图 3(A)和(D)可以看出, 当 TMOS 的加入量过少时, 会导致微囊向水相转移的过程中出现大面积的破损; 而当 TMOS 的加入量过多时, 过度的交联作用会导致微囊之间相互团聚. 如图 3(C)所示, 当 TMOS 的加入量为 100 μL 时, 微囊经过交联反应转移到水相后形貌保持较完整, 部分微囊可能由于囊内没有包封 GOx 而出现凹陷. 因此, 后续将使用经 100 μL TMOS 交联后的微囊开展实验.

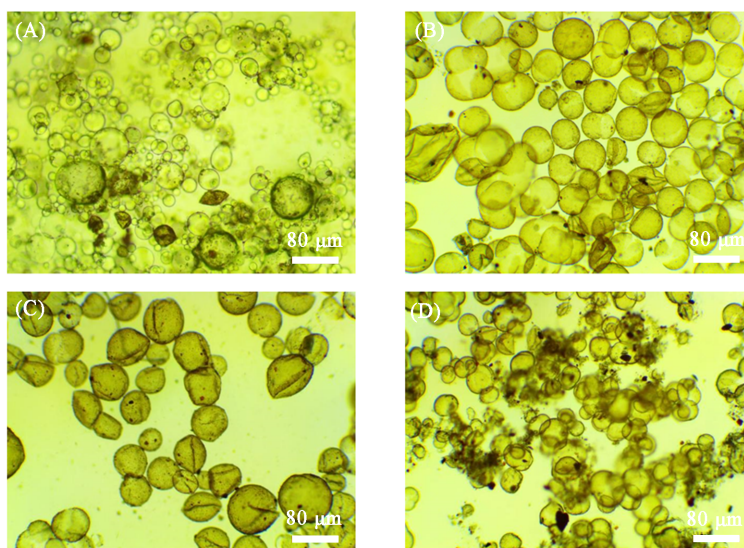


Fig. 3 Optical microscopy images showing the effect of TMOS cross-linking agent additions(50, 80, 100, 200 μL) on the intact structure of Fe_3O_4 -HNTs hollow microcapsules from aqueous phase

2.3 Fe_3O_4 -HNTs 的类过氧化物酶活性

首先, 对 Fe_3O_4 -HNTs 的类过氧化物酶活性进行了考察. 如图 4(A)所示, 在 Fe_3O_4 -HNTs、 H_2O_2 和 TMB 同时存在的条件下, 在 655 nm 处检测到最大吸收峰; 而在没有 TMB、 H_2O_2 或 Fe_3O_4 -HNTs 存在的条件下, 在 655 nm 处没有出现相应的吸收峰, 这与天然辣根过氧化物酶所具有的过氧化物酶催化特性一致^[28], 表明材料中的 Fe_3O_4 具有类过氧化物酶活性, 能与 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 随后 $\cdot\text{OH}$ 氧化 TMB, 产生 oxTMB 氧化物, 使溶液发生蓝色显色反应. 为验证反应体系中存在 $\cdot\text{OH}$, 以异丙醇作为 $\cdot\text{OH}$ 捕获剂加入到上述反应体系中, 如图 4(B)所示, 反应溶液在 655 nm 处的吸收峰强度减弱, 证明在反应过程中 Fe_3O_4 氧化 H_2O_2 产生了 $\cdot\text{OH}$.

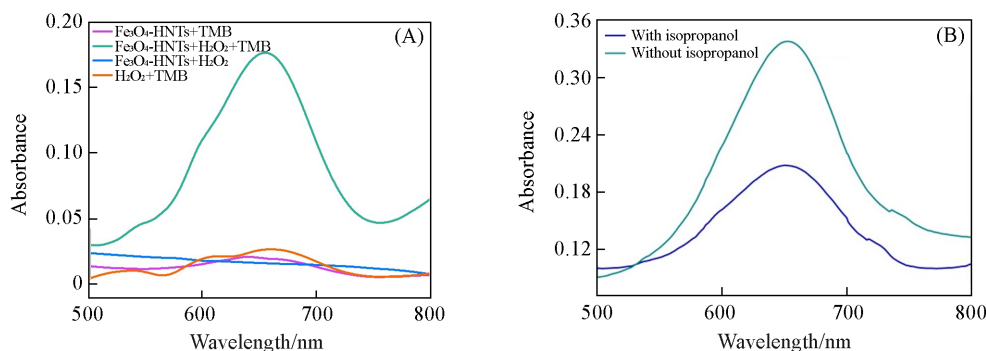


Fig. 4 UV-Vis absorption spectra of different systems(A) and the Fe_3O_4 -HNTs+ H_2O_2 +TMB system before and after the addition of isopropanol(B)

2.4 GOx@Fe₃O₄-HNTs 复合微囊级联反应的构筑

对所制备的GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊的级联催化性能进行了考察. 如图5(A)所示, 在无葡萄糖或TMB存在的条件下, 在655 nm处没有检测到相应的吸收峰; 而当GOx@Fe₃O₄-HNTs、葡萄糖和TMB同时存在时, 反应体系在655 nm处检测到特征吸收峰, 表明在有葡萄糖和TMB存在的条件下, 复合微囊内的GOx首先催化氧化葡萄糖产生葡萄糖酸和H₂O₂, 之后微囊壁中的Fe₃O₄催化H₂O₂原位生成活性自由基·OH, 最后·OH氧化底物TMB产生相应氧化物oxTMB, 从而使溶液由无色变为蓝色.

随后, 以GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊和GOx+Fe₃O₄-HNTs物理混合体系为考察对象, 研究了微囊固定封装GOx对于催化葡萄糖级联反应的影响. 从图5(B)~(D)可以看出, 在相同反应条件下, GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊体系在655 nm处的吸收峰强度是GOx+Fe₃O₄-HNTs物理混合体系的2.5倍, 其酶催化的相对活性提高了2.21倍, 且30 min内GOx@Fe₃O₄-HNTs体系的反应速度快于GOx+Fe₃O₄-HNTs体系, 表明以Fe₃O₄-HNTs为囊壁, 包封GOx构筑的GOx@Fe₃O₄-HNTs微囊反应器具有更优异的酶促级联催化性能. 其原因是微囊反应器中的GOx与Fe₃O₄-HNTs之间的核-壳结构形成了一个紧密的反应微室, 使得级联催化反应被限制于此微小空间内, 极大地缩短了天然酶、纳米酶以及活性物种之间的距离, 因此经固定化后的GOx催化葡萄糖原位产生的H₂O₂能立即与Fe₃O₄-HNTs进行反应, 降低了H₂O₂的扩散和自分解, 从而提高了酶促级联反应的催化效率.

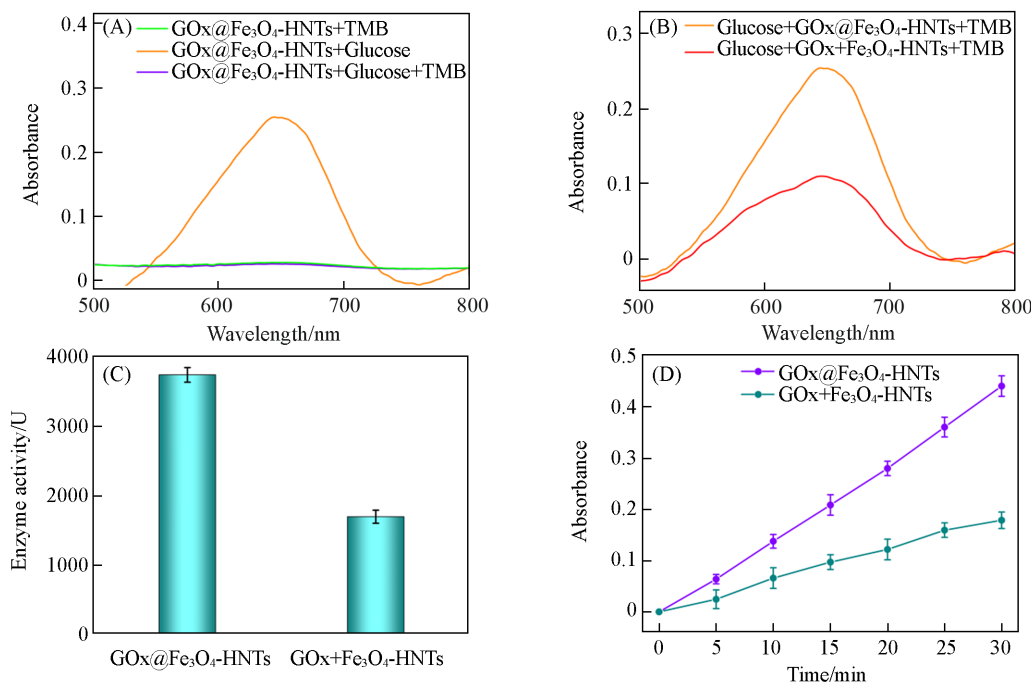


Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of GOx@Fe₃O₄-HNTs+Glucose+TMB, GOx@Fe₃O₄-HNTs+TMB and GOx@Fe₃O₄-HNTs+glucose systems(A) and of glucose+GOx+Fe₃O₄-HNTs+TMB and glucose+GOx@Fe₃O₄-HNTs+TMB in 0.1 mol/L NaAc-HAc buffer(B), cascade reaction enzymatic activities of GOx+Fe₃O₄-HNTs and GOx@Fe₃O₄-HNTs(C), and absorbance-time curves of Fe₃O₄-HNTs+GOx and GOx@Fe₃O₄-HNTs in 100 mmol/L glucose(D)

2.5 GOx@Fe₃O₄-HNTs 复合微囊的酶学性质

2.5.1 葡萄糖加入量和反应平衡时间的影响 葡萄糖是GOx@Fe₃O₄-HNTs反应体系中级联催化反应的能量来源, 考察了葡萄糖的加入量对于GOx@Fe₃O₄-HNTs反应体系催化效率的影响. 如图6(A)所示, 随着反应体系中葡萄糖加入量的逐渐增多, 级联催化反应活性呈现先增大后减小的趋势, 当葡萄糖溶液(0.1 mol/L)的添加量为300 μL时, 反应体系具有最佳反应活性. 随后, 在最佳葡萄糖添加量条件下, 考察了级联催化反应达到平衡状态的时间. 从图6(B)可以看出, 经过80 min后反应达到平衡. 因此, 以300 μL的葡萄糖添加量和80 min反应时间作为后续实验条件.

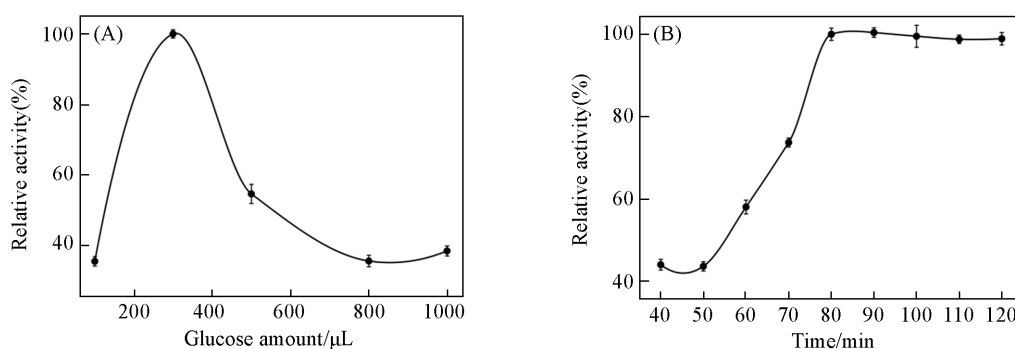


Fig. 6 Relative activity with different addition amounts of glucose solution(0.1 mol/L)(A) and at different reaction time(B) for cascade reactions in $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs microcapsules

2.5.2 温度和酸碱耐受性 对所制备的微囊反应器 $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 和天然酶体系 $\text{GOx}+\text{HRP}$ 在不同 pH 值和温度条件下的酶促级联催化反应的稳定性进行考察. 如图 7(A) 所示, 当反应温度高于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 时, $\text{GOx}+\text{HRP}$ 天然酶体系的催化活性显著降低, 相较于 $\text{GOx}+\text{HRP}$ 体系, $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 复合微囊在 $30\sim 90\text{ }^\circ\text{C}$ 温度条件下表现出了更优异的催化稳定性. 从图 7(B) 可以看出, 当反应体系的 pH 值为 $3.5\sim 6.0$ 时, $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 复合微囊的催化活性始终保持在 80% 以上, 而 $\text{GOx}+\text{HRP}$ 天然酶体系的催化活性在 pH 值达到 4 以后急剧下降. 研究结果表明, 所制备的 $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 微囊反应器比天然游离酶具有更高的温度和酸碱耐受性.

2.5.3 储存稳定性和重复使用性 对所制备的 $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 微囊反应器的储存稳定性和重复使用性进行了考察. 如图 7(C) 和 (D) 所示, 当 $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 复合微囊经过 7 次催化反应后, 其酶催化活性仍可保留 50% 以上, 且 $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs 复合微囊在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下储存 30 d 后的相对酶活性仍能保持 90% 以上. 由于天然酶具有较强的亲水性, 使用后无法回收利用, 本研究所构筑的纳米酶-天然酶微囊反应器表现出的优异反应稳定性和储存稳定性可极大地降低酶促催化反应的成本, 有利于其工业化实际应用.

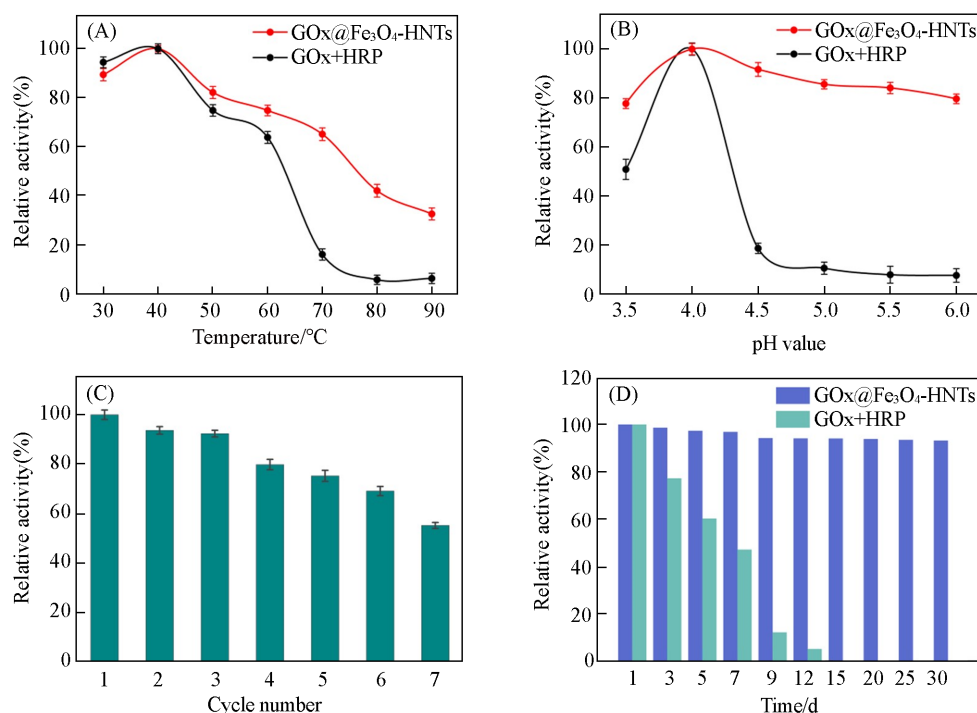


Fig. 7 Temperature stability(A) and pH stability(B) of $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs and $\text{GOx}+\text{HRP}$, recyclability of $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs(C) and storage stability of $\text{GOx}@Fe_3O_4$ -HNTs and $\text{GOx}+\text{HRP}$ (D)

2.5.4 级联反应的催化动力学 为了进一步研究 $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ 复合微囊的级联催化性能, 考察了两步酶促反应的稳态动力学参数. 取 Michaelis-Menten 方程曲线的双倒数形式, 以底物浓度倒数为横坐标, 反应初速度倒数 (v^{-1}) 为纵坐标, 分别绘制微囊内 GOx 催化氧化葡萄糖和囊壁中 Fe_3O_4 催化 H_2O_2 的 Lineweaver-Burk 图, 以获取其稳态动力学参数. 由图 8 和表 1 可知, 在葡萄糖氧化酶催化氧化葡萄糖产生 H_2O_2 反应中, 其米氏常数 (K_m) 值为 831.6 mmol/L, 大于 Fe_3O_4 催化 H_2O_2 反应的 K_m 值 (159.4 mmol/L), 表明 H_2O_2 与 Fe_3O_4 之间的亲和力高于 GOx 与葡萄糖之间的亲和力, 证明在此酶促级联反应体系中, 葡萄糖会首先与体系中的 GOx 结合生成 H_2O_2 , 之后 H_2O_2 再与 Fe_3O_4 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 并催化底物 TMB 显色. 此外, GOx 催化葡萄糖产生 H_2O_2 反应的最大反应速率为 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 大于 Fe_3O_4 催化 H_2O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 的速率 ($0.3 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), 说明 Fe_3O_4 催化 H_2O_2 反应是此酶促级联反应的限速步骤.

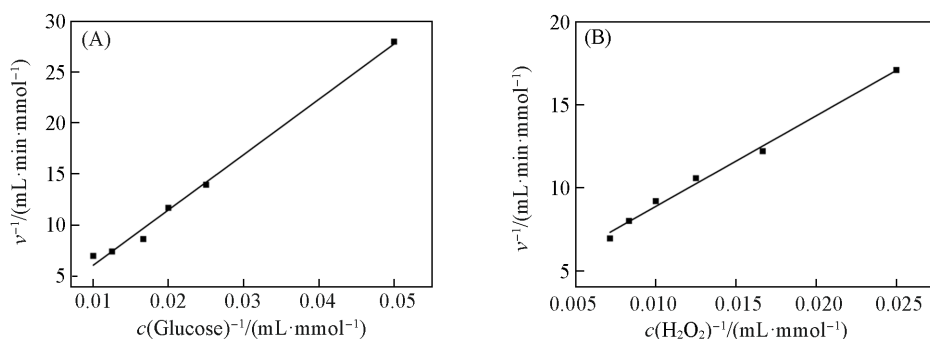


Fig. 8 Step-by-step Lineweaver-Burk diagrams of the cascade reactions of GOx -glucose(A) and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ (B) for $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ microcapsules

Table 1 Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (v_{\max}) of GOx -glucose and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ in $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ microcapsules

Catalyst	Substance	R^2	$K_m / (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$v_{\max} / (\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$
GOx	Glucose	0.993	831.6	1.5
Fe_3O_4	H_2O_2	0.996	159.4	0.3

在上述实验基础上, 进一步考察了在不同葡萄糖和 TMB 浓度条件下, $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ 微囊反应器级联反应体系的稳态动力学, 并与 GOx+HRP 天然酶体系进行对比. 由图 9 和表 2 可知, $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ 复合微囊对葡萄糖和 TMB 两种底物的亲和力 ($K_m=99.94, 1.95 \text{ mmol/L}$) 均低于 GOx+HRP 天然酶体系 ($K_m=2.13, 0.47 \text{ mmol/L}$), 而对葡萄糖和 TMB 底物的最大反应速率 v_{\max} ($0.38, 0.35 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) 大于 GOx+HRP 天然酶体系 ($V_{\max}=0.17, 0.19 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). 这表明以具有类过氧化物酶活性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 作为微囊壁材, 不但可以为酶促级联反应提供后续催化动力, 而且还能够为反应提供微反应空间, GOx 的酶固定化处理缩短了 GOx 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HNTs}$ 之间的传质距离, 使得反应生成的 H_2O_2 直接与壁材中的 Fe_3O_4 接触而发生催化反应, 可以最大限度地减少 H_2O_2 的扩散和自分解, 消除中间产物的积累, 从而提高酶促级联反应的催化性能.

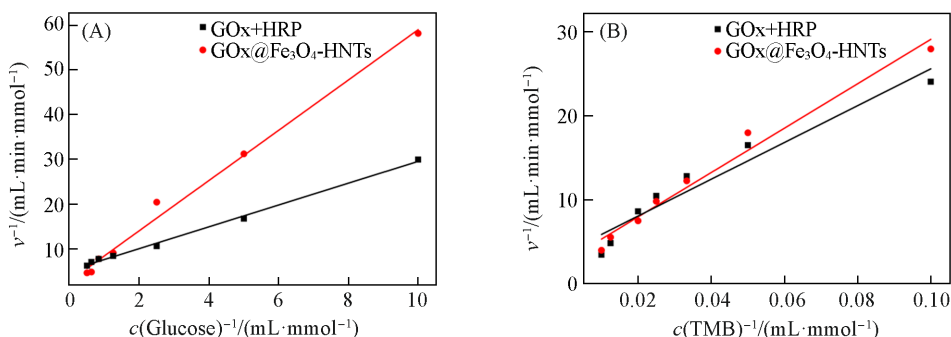


Fig. 9 Lineweaver-Burk plots of $\text{GOx}@Fe_3O_4\text{-HNTs}$ microcapsules and GOx+HRP system at different concentrations of glucose(A) and TMB(B)

Table 2 Michaelis constant(K_m) and maximum velocity(v_{max}) of GOx@Fe₃O₄-HNTs microcapsules and GOx+HRP system

Catalyst	Substance	R^2	$K_m/(mmol \cdot L^{-1})$	$v_{max}/(mmol \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1})$
GOx@Fe ₃ O ₄ -HNTs	Glucose	0.979	99.94	0.38
	TMB	0.993	1.95	0.35
GOx+HRP	Glucose	0.995	2.13	0.17
	TMB	0.996	0.47	0.19

2.6 GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊的葡萄糖检测

为了进一步证明GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊反应体系优异的酶促级联反应性能,在优化条件下研究了其葡萄糖检测功能.在反应体系温度为37℃,pH=4的条件下,将不同浓度的葡萄糖添加到GOx@Fe₃O₄-HNTs级联反应体系中.从图10(A)可以看出,随着葡萄糖添加浓度的增大,反应体系在655 nm处的吸光度逐渐增大,且溶液的颜色也逐渐加深.由图10(B)可知,反应体系的吸光度与葡萄糖的浓度呈线性关系: $y=0.00417x+0.1125(R^2=0.9817)$,相应的葡萄糖检出限(LOD)为0.65 μmol/L,表现出较高的检测灵敏度,表明以Fe₃O₄-HNTs为囊壁材料封装GOx所构建的复合微囊反应器在葡萄糖的比色检测应用中具有可行性.

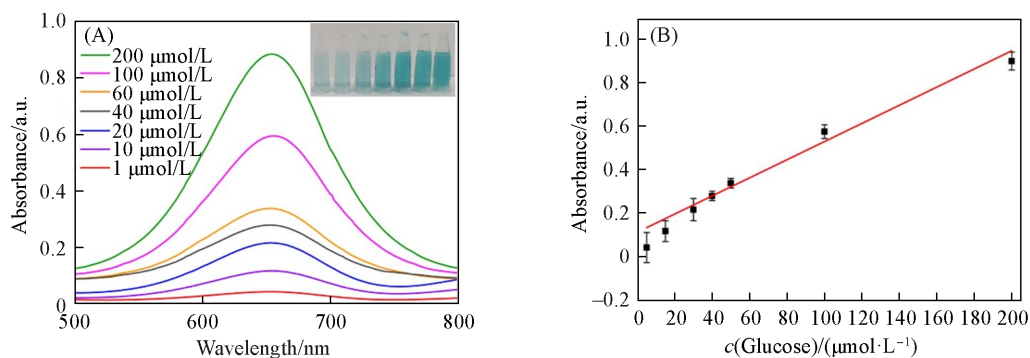


Fig. 10 UV-Vis absorption spectra and corresponding digital photo(inset) of cascade reactions of GOx@Fe₃O₄-HNTs with the glucose concentrations from 1 μmol/L to 200 μmol/L(A) and the linear calibration curve of glucose detection at 655 nm(B)

3 结 论

以GOx和Fe₃O₄分别作为天然酶和纳米酶,将GOx封装于经粘土矿物HNTs负载的Fe₃O₄-HNTs内部,构筑GOx@Fe₃O₄-HNTs仿生微囊反应器.当加入葡萄糖时,包封于囊内的GOx首先催化氧化葡萄糖生成葡萄糖酸和H₂O₂,然后H₂O₂被囊壁中Fe₃O₄催化氧化生成活性自由基·OH,·OH进而氧化底物TMB得到蓝色氧化物oxTMB,从而构建得到天然酶-纳米酶酶促级联催化反应体系.与游离酶反应体系相比,GOx@Fe₃O₄-HNTs复合微囊级联反应体系表现出更优异的催化效率、反应稳定性以及储存稳定性,这归因于由微囊所提供的内部空腔可以将GOx封装于其中,使得酶中间体的扩散被最小化,从而有利于酶促级联反应效率的提高.这项作为构建仿生型矿物基天然酶-纳米酶级联反应体系提供了新的启示,也可为后续生物分析与仿生催化领域的进一步研究提供参考.

参 考 文 献

- [1] Qu R., Shen L., Qu A., Wang R. L., An Y. L., Shi L. Q., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(30), 16694—16705
- [2] Mu J., He L. C., Fan W. P., Tang W., Wang Z. T., Jiang C., Zhang D. Y., Liu Y. J., Deng H. Z., Zou J. H., Jacobson O., Qu J. L., Huang P., Chen X. Y., *Small*, **2020**, 16(42), 1—8
- [3] Hwang E. T., Lee S., *ACS Catal.*, **2019**, 9(5), 4402—4425
- [4] Sheldon R. A., Pelt S. V., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6223—6235
- [5] Begum G., Goodwin W. B., Deglee B. M., Sandhage K. H., Kroeger N., *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3(2), 5232—5240

- [6] Zhao Z., Lin T., Liu W., Hou L., Ye F., Zhao S., *Spectrochim Acta A*, **2019**, *219*, 240—247
- [7] LI L., Sun S. Y., LYU R., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, *42*(3), 803—810(李柳, 孙仕勇, 吕瑞. 高等学校化学学报, **2021**, *42*(3), 803—810)
- [8] Sun H., Yang H., Huang W., Zhang S., *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, *450*, 353—360
- [9] Godoy-Gallardo M., Labay C., Trikalitis V. D., Kempen P. J., Larsen J. B., Andresen T. L., Hosta-Rigau L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*(19), 15907—15921
- [10] Zhang L., Shi J. F., Jiang Z. Y., Jiang Y. J., Qiao S. Z., Li J. A., Wang R., Meng R. J., Zhu Y. Y., Zheng Y., *Green Chem.*, **2011**, *13*(2), 300—306
- [11] Wang Q. Q., Zhang X. P., Huang L., Zhang Z. Q., Dong S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(50), 16082—16085
- [12] Cataldo S., Lazzara G., Massaro M., Muratore N., Pettignano A., Riela S., *Appl. Clay Sci.*, **2018**, *156*, 87—95
- [13] Kadam A. A., Jang J., Jee S. C., Sung J. S., Lee D. S., *Carbohydr. Polym.*, **2018**, *194*, 208—216
- [14] Kamaliev R. F., Ishmukhametov I. R., Batasheva S. N., Rozhina E. V., Fakhrullin R. F., *Nanostruct. Nanoobjects*, **2018**, *15*, 54—60
- [15] Yuan P., Tan D. Y., Annabi-Bergaya F., *Appl. Clay Sci.*, **2015**, *112*, 75—93
- [16] Zhang B. F., Guo H. Z., Yuan P., Deng L. L., Zhong X. M., Li Y., Wang Q., Liu D., *Cement Concrete Compf.*, **2020**, *110*, 103601—103614
- [17] Pandey G., Mungambe D. M., Tharmavaram M., Rawtani D., Agrawal Y. K., *Appl. Clay Sci.*, **2017**, *136*, 184—191
- [18] Zeng X., Wang Q., Wang H., Yang Y., *J. Mater. Sci.*, **2017**, *52*(14), 8391—8400
- [19] Massaro M., Campofelice A., Colletti C. G., Lazzara G., Noto R., Riela S., *Appl. Clay Sci.*, **2018**, *160*, 186—192
- [20] Chen L., Zhou C. H., Fiore S., Tong D. S., Zhang H., Li C. S., Ji S. F., Yu W. H., *Appl. Clay Sci.*, **2016**, *127*, 143—163
- [21] Liu S., Lu F., Xing R., Zhu J. J., *Chemistry*, **2011**, *17*(2), 620—625
- [22] Shen S., Huang D., Cao J., Chen Y., Zhang X., Guo S., Ma W., Qi X., Ge Y., Wu L., *J. Mater. Chem. B*, **2019**, *7*(7), 1096—1106
- [23] Maleki A., Hajizadeh Z., *Silicon*, **2019**, *11*(6), 2789—2798
- [24] Zhu X. X., Song P., Hou S. T., *Appl. Clay Sci.*, **2023**, *242*, 107022—107029
- [25] Duan J. M., Liu R. C., Chen T., *Desalination*, **2012**, *293*, 46—52
- [26] Nguyen L. T., Yang K. L., *Enzyme Microb. Technol.*, **2017**, *100*, 52—59
- [27] Zhu K. C., Duan Y. Y., Wang F., Gao P., Jia H. Z., Ma C. Y., Wang C. Y., *Chem. Eng. J.*, **2017**, *311*(3), 236—246
- [28] Albalawi A. E., Khalaf A. K., Alyousif M. S., Alanazi A. D., Baharvand P., Shakibaie M., Mahmoudvand H., *Biomed. Pharmacother.*, **2021**, *139*, 1—8

(Ed.: N, K, M)